

별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출원 번호 : 10-2004-0028105
Application Number

출원 년 월 일 : 2004년 04월 23일
Date of Application : APR 23, 2004

출원인 : 한국과학기술원
Applicant(s) : Korea Advanced Institute of Science and Techno

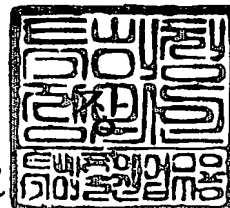


2004 년 05 월 20 일

특 허 청

COMMISSIONER

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)



【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2004.04.23
【발명의 명칭】	신규 루멘 박테리아 변이균주 및 이를 이용한 숙신산의 제조방법
【발명의 영문명칭】	Novel Rumen Bacteria Variants and Method for Preparing Succinic Acid Using the Same
【출원인】	
【명칭】	한국과학기술원
【출원인코드】	3-1998-098866-1
【대리인】	
【성명】	이처영
【대리인코드】	9-2003-000118-9
【포괄위임등록번호】	2003-015686-1
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이상엽
【성명의 영문표기】	LEE, SANG YUP
【주민등록번호】	640412-1025515
【우편번호】	305-761
【주소】	대전광역시 유성구 전민동 엑스포아파트 212-702
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이상준
【성명의 영문표기】	LEE, SANG JUN
【주민등록번호】	710829-1121313
【우편번호】	305-330
【주소】	대전광역시 유성구 지족동 대우아파트 305-604
【국적】	KR
【심사청구】	청구
【미생물기탁】	
【기탁기관명】	한국생명공학연구원 유전자은행(KCTC)
【수탁번호】	KCTC 10626BP

【수탁일자】 2004.04.22

【핵산염기 및 아미노산 서열목록】

【서열개수】 18

【서열목록의 전자파일】 첨부

【취지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인 이처영 (인)

【수수료】

【기본출원료】	0 면	38,000 원
【가산출원료】	37 면	0 원
【우선권주장료】	0 건	0 원
【심사청구료】	24 항	877,000 원
【합계】	915,000 원	
【감면사유】	정부출연연구기관	
【감면후 수수료】	457,500 원	

【요약서】

【요약】

본 발명은 루멘 박테리아에서 젖산, 개미산 및 초산 생성에 관여하는 젖산 탈수소화효소 유전자(ldhA), 피루브산-개미산 분해효소 유전자(pf1), 초산생성에 관여하는 포스포트랜스아세틸화효소 유전자(pta) 및 아세트산 키나제 유전자(ackA)를 모두 결실시킨 신규 루멘 박테리아 변이균주(만헤이미아 속 LPK7)와, 젖산 탈수소화효소 유전자(ldhA), 피루브산-개미산 분해효소 유전자(pf1) 및 숙신산을 생성하는 대사회로에서 이산화탄소의 고정에 관여하는 포스포피루브산 카르복실라제 유전자(ppc)를 모두 결실시킨 신규 루멘 박테리아 변이균주(만헤이미아 속 LPK4) 및 상기 변이균주들을 혐기적인 조건에서 배양하여 숙신산을 제조하는 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 만헤이미아 속 LPK7 및 LPK4 균주들은 여러가지 유기산을 생산하는 종래의 야생형의 균주에 비하여, 다른 유기산을 거의 생성하지 않으면서 고농도로 숙신산을 생성하는 특성을 가지고 있어 숙신산의 산업적 생산균주로 유용하다.

【대표도】

도 7

【색인어】

숙신산, 유기산, 젖산, 개미산, 만헤이미아 속

【명세서】**【발명의 명칭】**

신규 루멘 박테리아 변이균주 및 이를 이용한 숙신산의 제조방법 {Novel Rumen Bacteria Variants and Method for Preparing Succinic Acid Using the Same}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 pta 및 ackA 유전자 결실백터(pPTA-sacB)의 제작과정을 나타낸 것이다.

도 2는 ppc 유전자 결실백터(pPPC-sacB)의 제작과정을 나타낸 것이다.

도 3은 변이주 LPK 균주로부터 pta 및 ackA 유전자를 결실시켜 변이주LPK7을 제작하는 과정을 나타낸 것이다.

도 4는 변이주 LPK 균주로부터 ppc 유전자를 결실시켜 변이주 LPK4를 제작하는 과정을 나타낸 것이다.

도 5는 만헤이미아 속 변이주(LP7)의 pta 및 ackA 유전자 결실을 확인한 전기영동 사진이다. M은 1kb ladder size marker를, 레인 1은 PCR product P13 & P14(1.1kb)를, 레인 2는 PCR product P15 & P16(1.5kb)을 나타낸다.

도 6은 만헤이미아 속 변이주(LP4)의 ppc 유전자 결실을 확인한 전기영동 사진이다. M은 1kb ladder size marker를, 레인 1은 PCR product P13 & P17(1.1kb)을, 레인 2는 PCR product P15 & P18(1.5kb)을 나타낸다.

도 7은 이산화탄소로 포화된 혐기조건에서 만헤이미아 속 LPK7의 배양 특성을 나타낸 것이다.

도 8은 이산화탄소로 포화된 혐기조건에서 만헤이미아 속 LPK4의 배양 특성을 나타낸 것이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<9> 발명의 분야

<10> 본 발명은 루멘 박테리아에서 젖산, 개미산 및 초산 생성에 관여하는 젖산 탈수소화효소 유전자(ldhA), 피루브산-개미산 분해효소 유전자(pf1), 초산생성에 관여하는 포스포트랜스아세틸화효소 유전자(pta) 및 아세트산 키나제 유전자(ackA)를 모두 결실시킨 신규 루멘 박테리아 변이균주(만헤이미아 속 LPK7)와, 젖산 탈수소화효소 유전자(ldhA), 피루브산-개미산 분해효소 유전자(pf1) 및 숙신산을 생성하는 대사회로에서 이산화탄소의 고정에 관여하는 포스포피루브산 카르복실라제 유전자(ppc)를 모두 결실시킨 신규 루멘 박테리아 변이균주(만헤이미아 속 LPK4) 및 상기 변이균주들을 혐기적인 조건에서 배양하여 숙신산을 제조하는 방법에 관한 것이다.

<11> 발명의 배경

<12> 현재 석유화학공업의 발달로 인하여 대부분의 화학물질들이 석유 및 천연가스로부터 생산되고 있으나, 최근 지구온난화현상 등 환경문제의 대두로 전세계적으로 환경규제가 강화되어, 화학물질의 생산을 위한 대체공정의 개발에 대한 요구가 증가되고 있다.

- <13> 이에 따라, 미생물 배양기술과 유전공학적 기술의 획기적인 발달에 힘입어 생물공정에 의한 생물학적 물질의 생산이 점차 석유화학공정에 대하여 경쟁력을 갖게 되었다. 생물학적인 방법은 값싼 재생자원(renewable resource)을 원료로서 이용하고, 이산화탄소 등 지구온난화가스의 발생을 공정상에서 억제할 수 있기 때문에 환경문제를 근본적으로 해결할 수 있는 환경친화적 공정으로 알려져 있으므로, 균주개발 및 공정개선 등 원가절감을 위한 연구가 확대되고 있는 추세이다. 아울러, 생물학적 물질의 시장성이 매우 높아지고 있어, 미생물을 이용하여 생물자원(biomass)으로부터 생물학적 물질의 생산에 대한 연구가 전세계적으로 활발히 진행되고 있다.
- <14> 이러한 생물학적 물질 중에서, 숙신산(succinic acid)은 생분해성 플라스틱 모노머, 식품첨가제, 의약품의 전구물질, 기타 유기화합물의 중간체 등 그 다양한 이용성과 가격경쟁력을 갖추고 있어 이에 대한 관심이 날로 증가하는 추세이다.
- <15> 숙신산의 생물학적 생산에 대한 연구는 1938년 록우드(Lockwood) 등이 미생물인 푸사리움 마티(*Fusarium martii*)를 이용하여 당으로부터 18%의 수율로 숙신산을 생산한 것을 발표하면서 시작되었다. 그 후, 숙시니비브리오 텍스트리노솔벤스 (*Succinivibrio dextrinosolvens*), 피브로박터 숙시노게네스(*Fibrobacter succinogenes*), 루미노코커스 플라브파시엔스(*Ruminococcus flavefaciens*) 등을 포함한 다양한 종류의 혐기성 미생물이 포도당 대사를 통하여 숙신산을 최종산물로 생성하는 것으로 보고되었다 (Zeikus, *Annu. Rev. Microbiol.*, 34:423-64, 1980). 그 이후, 과량의 이산화탄소 존재시에 포도당으로부터 높은 농도와 수율로 숙신산을 생산하는 것으로 알려진 언에어로바이오스피리움 숙시니시프로두센스 (*Anaerobiospirillum succiniciproducens*)를 제외하고는, 산업적으로 유용한 높은 수율로 숙신산을 생산하는 균주는 보고되지 않았다 (David *et al.*, *Int. J. Syst. Bacteriol.*,

26:498-504, 1976). 그러나, 연에어로바이오스피리움 숙시니시프로두센스는 절대 혐기적인 미생물이기 때문에, 이를 이용하여 숙신산을 생산하는 발효공정은 미량의 산소에 노출되더라도 공정자체가 불안정해지는 단점이 있다.

<16> 미생물의 발효를 통해 유기산을 경제적으로 생산하기 위해서는 생산수율, 발효조건 등과 같은 여러가지 문제점의 해결이 선행되어야 하는데, 그 중에서도 가장 우선되어야 할 문제점은 새로운 균주의 개발이다. 현재 사용되는 대부분의 미생물은 혐기성 미생물로서, 배양을 위한 설비비용이 비싸고, 미량의 산소에 의한 발효실패의 확률이 높다는 단점이 있다.

<17> 이러한 단점을 개선하기 위하여, 산소에 대해 저항성을 가지면서 유기산의 생산성이 높은 균주인 만헤이미아 속 55E(*Mannheimia succiniciproducens* 55E)가 개발되었다. 그러나 상기 균주는 숙신산 외에도 개미산, 초산 및 젖산을 생성하기 때문에, 숙신산 이외의 다른 유기산을 제거하는 정제과정에서 비용증가와 수율저하의 문제가 있어, 이를 해결하고자 하는 노력이 절실히 요구되었다.

<18> 한편, 숙신산 생산을 위하여 재조합된 대장균에 대해서는 여러 문헌에서 보고된 바가 있다. 대장균의 경우는 젖산 탈수소화효소를 코딩하는 유전자와 피루브산-개미산 분해효소를 코딩하는 유전자가 결실되면, 혐기적 조건에서 거의 생육을 하지 못한다. 또한, 젖산은 발효산물로 나오지 않지만, 다른 대사산물인 초산과 에탄올이 숙신산 생산량의 절반가량을 각각 차지하여 산업화하기에는 수율이 너무 낮은 단점이 있다. 최근에는 이러한 단점을 보완하기 위하여, 호기조건에서 대장균의 균체를 증식시킨 다음, 다시 혐기조건으로 바꾸어 숙신산 발효를 유도한 논문(Vemuri et al., *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 28:325-32, 2002)이 발표된 바가 있으나, 여전히 생산성이 낮다는 단점이 있다.

- <19> 또한, 유전공학적 기법으로 숙신산 발효의 대사회로에서 이산화탄소를 고정하는 유전자인 pyruvate carboxylase, phosphoenolpyruvate carboxylase, pyruvate carboxykinase, malic enzyme 등을 대장균에 도입하여, 숙신산 생산성을 높인 예가 보고되어 있다 (Vemuri *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 68:1715-27, 2002; Millard *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 62:1808-10, 1996; Chao and Liao, *Appl. Environ. Microbiol.*, 59:4261-5, 1993; Stols and Donnelly, *Appl. Environ. Microbiol.*, 63:2695-701, 1997). 최근에는 이들 유전자를 대장균 이외에 루멘 박테리아(rumen bacteria)인 *Actinobacillus* sp.와 *Anaerobiospirillum* sp. 등의 다른 미생물에 도입하는 시도가 진행되고 있어, 상기 방법을 이용한 숙신산의 생산성 향상이 기대된다. 한편, 대장균에서 ptsG 유전자의 결실이 균체 생산과 숙신산의 생산성 향상에 기여하는 것으로 보고되어 있으나(Chatterjee *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 67:148-54, 2001), 대부분의 루멘 박테리아는 ptsG 유전자를 가지고 있지 않으므로, 대장균의 경우와 같이, ptsG 유전자를 제거하는 과정이 필요 없다는 장점이 있다.
- <20> 이에, 본 발명자들은 고수율로 숙신산을 생산하는 균주를 개발하기 위하여 예의 노력한 결과, 루멘 박테리아의 일종인 만헤이미아 속 55E(*Mannheimia succiniciproducens* 55E) 균주의 젖산 탈수소화효소 유전자(ldhA)와 피루브산-개미산 분해효소 유전자(pf1)를 결실시켜 제작된 변이균주 만헤이미아 속 LPK (*Mannheimia* sp. LPK KCTC 10558BP) 균주로부터 포스포트랜스아세틸화효소 유전자(pta)와 아세트산 키나제 유전자(ackA) 및 포스포피루브산 카르복실라제 유전자(ppc)를 각각 결실시켜 제작된 변이균주들(*Mannheimia* sp. LPK7 및 LPK4)이 혐기적 조건하에서 숙신산을 고수율로 생산하는 것을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

- <21> 결국, 본 발명의 주된 목적은, 혐기적 조건에서 다른 유기산은 생성하지 않으면서 숙신산을 고수율 및 고농도로 생성하는 루멘 박테리아 변이균주 및 그 제조방법을 제공하는데 있다.
- <22> 본 발명의 다른 목적은 상기 변이균주들을 혐기적 조건하에서 배양하는 것을 특징으로 하는 숙신산의 제조방법을 제공하는데 있다.

【발명의 구성 및 작용】

- <23> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 루멘 박테리아 변이균주에 있어서, 젖산 탈수소화효소를 코딩하는 유전자(ldhA), 피루브산-개미산 분해효소를 코딩하는 유전자(pf1), 포스포트랜스아세틸화효소를 코딩하는 유전자(pta) 및 아세트산 키나제를 코딩하는 유전자(ackA)가 결실되어 있고, 혐기적 조건에서 다른 유기산은 거의 생성하지 않으면서 숙신산을 고농도로 생성하는 특성을 가지는 루멘 박테리아 변이균주를 제공한다.
- <24> 본 발명은 또한, 루멘 박테리아 변이균주에 있어서, 젖산 탈수소화효소를 코딩하는 유전자(ldhA), 피루브산-개미산 분해효소를 코딩하는 유전자(pf1) 및 포스포피루브산 카르복실라제를 코딩하는 유전자(ppc)가 결실되어 있고, 혐기적 조건에서 다른 유기산은 거의 생성하지 않으면서 숙신산을 고농도로 생성하는 특성을 가지는 루멘 박테리아 변이균주를 제공한다.
- <25> 본 발명에 있어서, 상기 루멘 박테리아는 만헤이미아 속(*Mannheimia* sp.), 액티노바실러스 속(*Actinobacillus* sp.) 및 엔에어로바이오스피리illum 속(*Anaerobiospirillum* sp.)으로 구성된 군에서 선택될 수 있고, 다른 유기산은 생성하지 않으면서 숙신산만을 생성하는 동형발효

균주인 것을 특징으로 할 수 있다. 본 발명의 바람직한 구현예에서 있어서, 상기 루멘 박테리아 변이균주는 만헤이미아 속 LPK7 또는 LPK4이다.

<26> 본 발명은 또한, 만헤이미아 속(*Mannheimia* sp.), 액티노바실러스 속(*Actinobacillus* sp.) 및 언에어로바이오스피리illum 속(*Anaerobiospirillum* sp.)으로 구성된 군에서 선택되고, 젖산 탈수소화효소를 코딩하는 유전자(ldhA) 및 피루브산-개미산 분해효소를 코딩하는 유전자(pf1)가 결실되어 있는 루멘 박테리아 균주로부터 포스포트랜스아세틸화효소를 코딩하는 유전자(pta) 및 아세트산 키나제를 코딩하는 유전자(ackA)를 추가로 결실시키는 것을 특징으로 하는, 혐기적 조건에서 다른 유기산은 거의 생성하지 않으면서 숙신산을 고농도로 생성하는 특성을 가지는 루멘 박테리아 변이균주의 제조방법을 제공한다.

<27> 상기 변이균주의 제조방법에 있어서, 상기 pta 및 ackA 유전자의 결실은 상동성 재조합에 의해 수행되는 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 상동성 재조합은 결실된 pta 및 ackA 유전자를 포함하는 유전자 교환벡터를 사용하여 수행되는 것을 특징으로 할 수 있으며, 상기 결실된 pta 및 ackA 유전자를 포함하는 유전자 교환벡터는 pPTA-sacB인 것을 특징으로 할 수 있다.

<28> 본 발명은 또한, 만헤이미아 속(*Mannheimia* sp.), 액티노바실러스 속(*Actinobacillus* sp.) 및 언에어로바이오스피리illum 속(*Anaerobiospirillum* sp.)으로 구성된 군에서 선택되고, 젖산 탈수소화효소를 코딩하는 유전자(ldhA) 및 피루브산-개미산 분해효소를 코딩하는 유전자(pf1)가 결실되어 있는 루멘 박테리아 균주로부터 포스포피루브산 카르복실라제를 코딩하는 유전자(ppc)를 추가로 결실시키는 것을 특징으로 하는, 혐기적 조건에서 다른 유기산은 거의 생성하지 않으면서 숙신산을 고농도로 생성하는 특성을 가지는 루멘 박테리아 변이균주의 제조방법을 제공한다.

- <29> 상기 변이균주의 제조방법에 있어서, 상기 ppc 유전자의 결실은 상동성 재조합에 의해 수행되는 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 상동성 재조합은 결실된 ppc 유전자를 포함하는 유전자 교환벡터를 사용하여 수행되는 것을 특징으로 할 수 있으며, 상기 결실된 ppc 유전자를 포함하는 유전자 교환벡터는 pPPC-sacB인 것을 특징으로 할 수 있다.
- <30> 본 발명에 있어서, 상기 젖산 탈수소화효소를 코딩하는 유전자(ldhA) 및 피루브산-개미산 분해효소를 코딩하는 유전자(pf1)가 결실되어 있는 루멘 박테리아 균주는 만헤이미아 속 LPK 균주(KCTC 10558BP)인 것을 특징으로 할 수 있다.
- <31> 본 발명은 또한, 결실된 pta 및 ackA 유전자를 포함하는 유전자 교환벡터 pPTA-sacB와, 결실된 ppc 유전자를 포함하는 유전자 교환벡터 pPPC-sacB를 제공한다.
- <32> 본 발명은 또한, 상기 루멘 박테리아 변이균주를 혐기적 조건에서 배양하는 단계; 및 상기 배양액으로부터 숙신산을 회수하는 단계를 포함하는 숙신산의 제조방법을 제공한다.
- <33> 본 발명에 있어서, '결실'이란 용어는 상기 유전자에 의해 코딩되는 효소가 생성되지 못하도록 해당 유전자를 변형시킨 것을 모두 포괄한다.
- <34> 본 발명자들은 루멘 박테리아의 일종인 만헤이미아 속 55E(*Mannheimia succiniciproducens* 55E) 균주의 유전체 정보로부터, 젖산 탈수소화효소 유전자(ldhA)와 피루브산-개미산 분해효소 유전자(pf1)를 각각 찾은 다음, 유전자 결실벡터를 이용하여 만헤이미아 속 55E(*Mannheimia succiniciproducens* 55E)의 유전체에서 상기 두개의 유전자를 모두 제거하여 변이균주[만헤이미아 속 LPK(*Mannheimia* sp. LPK, KCTC 10558BP)]를 제작한 바 있다 (대한민국 특허출원번호 10-2003-84934). 본 발명에서는 상기 만헤이미아 속 LPK(KCTC 10558BP) 균주로부터, pta-ackA 유전자와 ppc 유전자를 각각 결실시켜 신규 변이균주를 제작하였고, 이들

신규 변이균주가 다른 유기산은 거의 생성하지 않으면서, 숙신산을 고농도로 생산하는 것을 확인하였다.

- <35> 상기 숙신산을 고농도로 생산하는 신규 변이균주를 각각 만헤이미아 속 LPK7 (*Mannheimia* sp. LPK7) 및 만헤이미아 속 LPK4 (*Mannheimia* sp. LPK4)로 명명하고, LPK7 균주를 2004년 4월 22일자로 국제기탁기관인 한국생명공학연구원(KRIBB) 유전자은행(KCTC, 대한민국 대전광역시 유성구 어은동 52소재)에 기탁번호 'KCTC 10626BP'로 기탁하였다.
- <36> 본 발명의 변이균주 LPK4 및 LPK7는 모균주인 만헤이미아 속 LPK(*Mannheimia* sp. LPK, KCTC 10558BP)와 같이, 통성혐기성, 그람음성, 비운동성의 단간(rod) 또는 코코바실라이(cocobacilli) 균으로서, 내생포자(endospore)를 생성하지 않는 특성을 가지며, 혐기조건에서 숙신산을 생산할 수 있다. 상기 균주는 30~50℃의 온도범위에서 생육이 관찰되나, 최적 생육온도는 39℃이고, 6.0~7.5의 pH범위에서 생육이 관찰되나, 최적생육 pH는 6.5이다.
- <37> 본 발명에 있어서, 상기 혐기적 조건은 이산화탄소 및/또는 질소를 이용하여 조성하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 숙신산의 수율을 높이기 위해서는 이산화탄소를 사용하여 조성하는 것이 가장 바람직하다.
- <38> 혐기적 조건은 이산화탄소 또는 질소를 0.1~0.4vvm, 바람직하게는 0.2~0.3vvm, 가장 바람직하게는 0.25vvm의 유속으로 공급하여 조성되고, 호기적 조건은 산소를 0.5~1.0vvm, 바람직하게는 0.7~0.8vvm, 가장 바람직하게는 0.75vvm의 유속으로 공급하여 조성된다. 배양에 사용되는 배지는 특별히 제한되지 않으나, 포도당 농도가 바람직하게는 5~60g/L이고, 가장 바람직하게는 20g/L이며, 배양온도는 35~45℃, 바람직하게는 38~41℃, 가장 바람직하게는 39℃의 온도와, 6.0~7.5, 바람직하게는 6.3~6.7, 가장 바람직하게는 6.5의 pH 조건하에서 수행된다.

- <39> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.
- <40> 특히, 하기 실시예에서는 젖산 탈수소화효소를 코딩하는 유전자(ldhA)와 피루브산-개미산 분해효소를 코딩하는 유전자(pfl)를 결실된 만헤이미아 속(*Mannheimia* sp.) 균주로부터 pta-ackA 유전자 및 ppc 유전자를 각각 결실시켜 변이균주를 수득한 다음, 이를 이용하여 숙신산을 고농도로 생성하는 방법만을 예시하였으나, 액티노바실러스 속(*Actinobacillus* sp.), 엔에어로바이오스피리illum 속(*Anaerobiospirillum* sp.) 등 다른 루멘 박테리아 균주를 사용하여 상기 유전자가 결실된 변이균주를 수득하고, 이를 이용하여 숙신산을 제조하는 것 역시 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.
- <41> 또한, 하기 실시예에서는 특정 배지와 배양방법 만을 예시하였으나, 본 발명자들이 문헌에 보고한 바와 같이(Lee *et al.*, *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 26:63-7, 2003; Lee *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 58:663-8, 2002; Lee *et al.*, *Biotechnol. Lett.*, 25:111-4, 2003, Lee *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 54:23-7, 2000; Lee *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.*, 72:41-8, 2001), 유청(whey), CSL(corn steep liquor) 등의 당화액과 다른 배지를 사용한 경우나, 유가배양(fed-batch culture), 연속배양(continuous culture) 등 다양한 방법을 사용한 것도 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

<42> 실시예 1: pta 및 ackA 결실벡터(pPTA-sacB)의 제작

<43> 포스포트랜스아세틸화효소 유전자(pta)와 아세트산 키나제 유전자(ackA)를 상동성 재조합(homologous recombination) 방법으로 파괴하기 위하여, 유전자 교환벡터(gene replacement vector)를 다음과 같이 제작하였다.

<44> 먼저, 만헤이미아 속 LPK 균주(KCTC 10558BP)의 게놈 DNA를 주형으로 하고, 하기 서열번호 1과 2의 프라이머를 사용하여 PCR을 수행한 다음, 얻어진 PCR 절편을 *Xba*I과 *Bam*HI으로 절단하고, 이를 pUC19(New England Biolabs, Inc., Beverly, Mass.)에 도입하여 pUC19-PTA1를 제작하였다.

<45> 서열번호 1: 5'-GCTCTAGATATCCGCAGTATCACTTTCTGCGC

<46> 서열번호 2: 5'-TCCGCAGTCGGATCCGGGTTAACCGCACAG

<47> 그런 다음, 만헤이미아 속 LPK 균주의 게놈 DNA를 주형으로 하고, 하기 서열번호 3과 4의 프라이머를 사용하여 PCR을 수행한 다음, 얻어진 PCR 절편을 *Xba*I과 *Sac*I으로 절단하고, 이를 상기 pUC19-PTA1에 도입하여 pUC19-PTA12를 제작하였다.

<48> 서열번호 3: 5'-GGGGAGCTCGCTAACTTAGCTTCTAAAGGCCATGT TTCC

<49> 서열번호 4: 5'-GCTCTAGATATCCGGGTCAATATCGCCGCAAC

<50> 스펙티노마이신 내성유전자(GenBank X02588)를 함유한 플라스미드 pIC156(Steinmetz *et al.*, *Gene*, 142:79-83, 1994)을 주형으로 하고, 하기 서열번호 5과 6의 프라이머를 사용하여 PCR을 수행한 다음, 얻어진 PCR 절편(스펙티노마이신 내성유전자)을 *Eco*RV로 절단하고, 이를 상기 pUC19-PTA12에 도입하여 스펙티노마이신 내성유전자를 가진 pUC19-PTA1S2를 제작하였다.

<51> 서열번호 5: 5'-GAATTCGAGCTCGCCCGGGGATCGATCCTC

<52> 서열번호 6: 5'-CCCGGGCCGACAGGCTTTGAAGCATGCAAATGTCAC

<53> 상기 제작된 pUC19-PTA1S2를 SacI과 BamHI으로 절단한 다음, pUC19-SacB에 도입하여, pPTA-sacB 벡터를 제작하였다. 상기 pUC19-sacB는 sacB 유전자(Genbank 02730)를 함유한 pKmobsacB(Schafer *et al.*, Gene, 145:69-73, 1994)를 주형으로 하고, 하기 서열번호 7과 8의 프라이머를 사용하여 PCR을 수행한 다음, 수득된 sacB 유전자 산물을 PstI 과 BamHI으로 절단하고, 이를 pUC19의 제한효소 자리에 삽입하여 제작하였다.

<54> 서열번호 7: 5'-AGCGGATCCCCTTCTATCGCCTTCTTGACG

<55> 서열번호 8: 5'-GTCCTGCAGGGCTACAAAATCACGGGCGTC

<56> 실시예 2: ppc 결실벡터(pPPC-sacB)의 제작

<57> 포스포피루브산 카르복실라제 유전자(ppc)를 상동성 재조합방법으로 파괴하기 위하여, 유전자 교환벡터를 다음과 같이 제작하였다.

<58> 먼저, 만헤이미아 속 LPK 균주의 게놈 DNA를 주형으로 하고, 하기 서열번호 9와 10의 프라이머를 사용하여 PCR을 수행한 다음, 얻어진 PCR 절편을 *Xba*I과 *Bam*HI으로 절단하고, 이를 pUC19(New England Biolabs, Inc., Beverly, Mass.)에 도입하여 pUC19-PPC1를 제작하였다.

<59> 서열번호 9: 5'-TACGGATCCCCAGAAAATCGCCCCCATGCCGA

<60> 서열번호 10: 5'-GCTCTAGATATCGTTTGATATTGTTCCGCCACATTTG

<61> 그런 다음, 만헤이미아 속 LPK 균주의 게놈 DNA를 주형으로 하고, 하기 서열번호 11과 12의 프라이머를 사용하여 PCR을 수행한 다음, 얻어진 PCR 절편을 *Xba*I과 *Sac*I으로 절단하고, 이를 상기 pUC19-PPC1에 도입하여 pUC19-PPC12를 제작하였다.

<62> 서열번호 11: 5'-GCTCTAGATATCCGTCAGGAAAGCACCCGCCATAGC

<63> 서열번호 12: 5'-GGGGAGCTCGTGTGGCGCTGCGGAAGTAAGGCAAAAATC

<64> *EcoRV*로 절단한 스펙티노마이신 내성유전자(실시에 1참조)를 상기 pUC19-PPC12에 도입하여 pUC19-PPC1S2를 제작하고, 이것을 *SacI*과 *BamHI*으로 절단한 다음, 상기 pUC19-SacB에 도입하여, pPPC-sacB 벡터를 제작하였다.

<65> 실시에 3: 만헤이미아 속 LPK7 및 LPK4 균주의 제작

<66> 도 3 및 도 4는 만헤이미아 속 LPK 균주의 *pta-ackA* 및 *ppc* 유전자를 각각 결실시켜 변이주들(LPK7 및 LPK4)을 제작하는 과정을 나타낸 것이다.

<67> 만헤이미아 속 LPK 균주를 LB-글루코스(10g/L 농도의 글루코스를 함유한 Luria-Bertani 배지) 배지에 도말하였다. 36시간 동안 37℃ 배양기에서 배양한 다음, 콜로니를 LB-글루코스 액체배지 10ml에 접종하여, 12시간 배양하였다. 충분히 자란 배양액을 LB-글루코스 액체배지 100ml에 1% 접종하여 200rpm 37℃ 진탕 배양기에서 배양하였다.

<68> 약 4-5시간 후, OD가 0.2-0.3 정도가 되면, 이것을 4℃ 4000rpm 10분 조건으로 원심분리하여 세포를 수득하였다. 상등액은 버리고, 4℃ 상태의 10% 글리세롤(glycerol) 용액 200ml로 세포를 재현탁하였다. 다시 4℃, 4000rpm, 10분 조건으로 원심분리하여 세포를 수득하였다. 상등액은 버리고, 4℃, 10% 글리세롤 용액 200ml로 세포를 재현탁하고, 4℃, 4000rpm, 10min 조건으로 원심분리하여 세포를 수득하였다. 세포와 글리세롤 부피비가 1:1이 되도록 글리세롤 양을 조절하여 재현탁하였다.

- <69> 이렇게 얻은 세포 농축액과 실시예 1 및 2에서 제작된 유전자 교환벡터 pPTA-sacB 및 pPPC-sacB를 혼합한 다음, 1.8kV, 25 μ F, 200ohms의 조건으로 일렉트로포레이션 (electroporation)을 수행하였다. 전기충격후, LB-글루코스 액체배지 1ml을 가하여 200rpm 37 $^{\circ}$ C 진탕 배양기에서 1시간동안 배양하였다.
- <70> 배양액을 스펙티노마이신 항생제(최종농도 50 μ g/ml)를 함유한 LB-글루코스 고체배지에 도말하여, 37 $^{\circ}$ C에서 48시간이상 배양한 후, 콜로니가 형성되는지 관찰하였다. 콜로니가 형성되면, 이중교차(double crossover)만 일어난 것을 골라내기 위해, 이것을 스펙티노마이신 항생제(최종농도 50 μ g/ml)을 함유한 LB-수크로스 배지(100g/L 농도의 수크로스를 함유한 Luria-Bertani 배지)에 도말(streaking)하였다. 24 시간후에 형성된 콜로니를 다시 한번 더 같은 플레이트에 도말하였다.
- <71> 상기 플레이트에서 형성된 콜로니(변이주)를 항생제가 함유된 LB-glucose 액체배지에서 배양하고, 배양된 균주로부터, 로첼(Rochelle)의 방법(Rochelle *et al.*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 100:59-66, 1992)을 응용하여 게놈 DNA(genomic DNA)를 분리하였다. 상기 분리된 변이주의 게놈 DNA를 주형으로 하여 PCR을 수행한 다음, PCR 산물을 전기영동하여 pta-ackA 유전자 및 ppc 유전자의 결실여부를 각각 확인하였다.
- <72> pta-ackA 유전자의 결실여부를 확인하기 위하여, 하기와 같이 2번의 PCR을 수행하였다. 우선, 상기 변이주의 게놈 DNA를 주형으로 하고, 하기 서열번호 13과 14의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 다음으로, 상기 변이주의 게놈 DNA를 주형으로 하고, 하기 서열번호 15과 16의 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하였다.
- <73> 서열번호 13: 5'-CCTGCAGGCATGCAAGCTTGGGCTGCAGGTCGACTC

<74> 서열번호 14: 5'-GCTGCCAAACAACCGAAAATACCGCAATAAACGGC

<75> 서열번호 15: 5'-GCATGTAACTTTACTGGATATAGCTAGAAAAGGCATCGGGGAG

<76> 서열번호 16: 5'-GCAACGCGAGGGTCAATACCGAAGGATTTGCGCCG

<77> 상기 두 차례의 PCR 반응에서 얻어진 반응물을 겔 전기영동하여 그 크기로 pta-ackA 유전자의 결실여부를 확인하였다 (도 5). 도 5에서, M은 1kb ladder size marker를, 레인 1은 PCR product P13 & P14(1.1kb)를, 레인 2는 PCR product P15 & P16(1.5kb)을 나타낸다. pta-ackA 유전자 결실은 서열번호 13과 14의 프라이머(P13 & P14)를 사용한 PCR 결과물이 1.1kb로 얻어지고, 동시에 서열번호 15와 16의 프라이머(P15 & P16)를 사용한 PCR 결과물이 1.5kb로 얻어지는 것으로 확인하였다. 프라이머의 위치는 도 3에 표시하였다. 상기 방법으로 제작된 변이균주, 즉 만헤이미아 속 LPK의 pta-ackA 유전자가 결실된 만헤이미아 속 균주를 만헤이미아 속 LPK7(*Mannheimia* sp. LPK7)로 명명하고, 이를 국제기탁기관인 KCTC에 기탁번호 'KCTC 10626BP'로 기탁하였다.

<78> 또한, ppc 유전자의 결실여부를 확인하기 위하여, 하기와 같이 2번의 PCR을 수행하였다. 우선, 상기 변이주의 게놈 DNA를 주형으로 하고, 하기 서열번호 13과 17의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 다음으로, 상기 변이주의 게놈 DNA를 주형으로 하고, 하기 서열번호 15와 18의 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하였다.

<79> 서열번호 17: 5'-GATCCAGGGAATGGCACGCAGGCTTTCAACGCCGCC

<80> 서열번호 18: 5'-GCAAAGCCAGAGGAATGGATGCCATTAAC CAATAGCG

<81> 상기 두차례의 PCR 반응에서 얻어진 반응물을 겔 전기영동하여 그 크기로 ppc 유전자의 결실여부를 확인하였다 (도 6). 도 6에서, M은 1kb ladder size marker를, 레인 1은 PCR

product P13 & P17(1.1kb)을, 레인 2는 PCR product P15 & P18(1.5kb)을 나타낸다. ppc 유전자의 결실은 서열번호 13과 17의 프라이머(P13 & P17)를 사용한 PCR 결과물이 1.1kb로 얻어지고, 동시에 서열번호 15와 18의 프라이머(P15 & P18)를 사용한 PCR 결과물이 1.5kb로 얻어지는 것으로 확인하였다. 프라이머의 위치는 도 4에 표시하였다. 상기 방법으로 제작된 변이균주, 즉 만헤이미아 속 LPK의 ppc 유전자가 결실된 만헤이미아 속 균주를 만헤이미아 속 LPK4 (*Mannheimia* sp. LPK4)로 명명하였다.

<82> 실시예 4: LPK7 및 LPK4의 발효특성

- <83> 상기 실시예 3에서 제작된 만헤이미아 속 LPK7와 LPK4의 발효능을 알아보기 위하여, 이산화탄소로 포화된 혐기적 조건에서 배양하고, 이로부터 생산되는 반응산물을 분석하였다.
- <84> 먼저, 20g/L의 포도당, 5g/L의 폴리펩톤, 5g/L의 효모추출물, 3g/L의 K_2HPO_4 , 1g/L의 NaCl, 1g/L의 $(NH_4)_2SO_4$, 0.2g/L의 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.2g/L의 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 및 10g/L의 $MgCO_3$ 로 구성된 전배양 배지 200ml를 제조하고, 이에 탄산가스를 주입한 다음, 만헤이미아 속 LPK7 및 LPK4를 각각 접종한 후, 39℃에서 24시간동안 전배양을 수행하였다.
- <85> 이어, 18g/L(최종 100mM)의 포도당, 5g/L의 폴리펩톤, 5g/L의 효모추출물, 3g/L의 K_2HPO_4 , 1g/L의 NaCl, 5g/L의 $(NH_4)_2SO_4$, 0.2g/L의 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.2g/L의 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 및 5g/L의 Na_2CO_3 으로 구성된 본 배양배지 1.8L를 6.6L의 배양조에 넣고, 100ml의 전배양된 미생물을 접종한 다음, 39℃의 온도와 pH 6.5의 조건하에서 탄산가스를 0.25vvm의 유속으로 공급하면서 회분식 배양을 수행하였다. 배양진행 중, 시간별로 배양기로부터 배지를 채취하고, 이로부터 설탕농도, 숙신산, 포도당,

젖산, 초산 및 개미산의 양을 측정하였다. 배양액 내의 세포농도는 분광광도계 (spectrophotometer, Ultraspec 3000, Pharmacia Biotech., Sweden)를 이용하여 측정하였고, 배지내에 포함된 숙신산, 포도당, 젖산, 초산 및 개미산의 양을 HPLC(Aminex HPX-87H column, Bio-Rad, USA)로서 측정하였다 (도 7 및 도 8). 도 7과 8에서 심볼은 각각 배양시간에 따른 세포농도(위 ●), 숙신산(아래 ●), 포도당(□), 개미산(◆) 및 초산(▲)의 농도변화를 나타낸다.

<86> 도 7에 나타난 바와 같이, 만헤이미아 속 LPK7의 22시간의 배양 후에 소모된 포도당의 농도는 100mM이었고, 생성된 숙신산의 농도는 124mM이었다. 이에 따른 숙신산의 수율(생성된 숙신산의 양/소모된 포도당의 양)은 몰비율로 124% 이었다. 그리고, 아세트산의 생성이 현저하게 줄어들었다 (표 1).

<87> 【표 1】

혐기조건에서 LPK4 및 LPK7의 발효산물과 55E의 발효산물 비교

Strain	Fermentation products (mM)						S/A ratio (fold)
	Succinate	Acetate	Formate	Lactate	Pyruvate	Ethanol	
MBEL55E	99.1	40.6	53.8	8.2	13	<1.0	2.44 (1.0)
LPK4	123.7±6.2	28.1±5.4	ND	ND	12.2±6.3	<1.0	4.40 (1.8)
LPK7	124.0±5.2	5.2±0.2	ND	ND	36.36±4.7	<1.0	23.84 (9.8)

<88> 또한, 도 8에 나타난 바와 같이, 만헤이미아 속 LPK4의 22시간의 배양 후에 소모된 포도당의 농도는 100mM이었고, 생성된 숙신산의 농도는 123.7mM이었다. 이에 따른 숙신산의 수율(생성된 숙신산의 양/소모된 포도당의 양)은 몰비율로 123.7% 이었다. 그리고, 아세트산의 생성이 야생형에 비해서 크게 줄어들었다 (표 1).

- <89> 본 발명의 만헤이미아 속 LPK7을 이산화탄소로 포화된 혐기적 조건에서 배양하여 수득하는 숙신산의 생산방법은, 모균주인 만헤이미아 속 55E를 이산화탄소로 포화된 혐기적 조건에서 배양하여 수득하는 숙신산의 생산방법보다 수율면에서 크게 향상되었으며, 숙신산/초산의 비율면이 9.8배나 향상됨으로서, 부산물이 거의 없이 숙신산을 수득할 수 있었다 (표 1).
- <90> Bulter 등에 의하면, 지금까지 알려진 미생물에서 초산 생성 유전자를 모두 파괴시켜도, 아직까지 밝혀지지 않은 아미노산과 지방산의 물질대사에서도 상당량 생성된다고 알려져 있다 (Bulter *et al.* *PNAS*, 101:2299-304, 2004). 따라서, 본 발명에서는 현재까지 알려진 아세트산 생성 경로를 모두 차단한 것으로, 동형 숙신산 발효를 이루었다.
- <91> 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

【발명의 효과】

- <92> 이상에서 상세히 설명하고 입증하였듯이, 본 발명은 루멘 박테리아의 젖산 탈수소화효소를 코딩하는 유전자(ldhA)와 피루브산-개미산 분해효소를 코딩하는 유전자(pf1), 포스포트랜스아세틸화효소를 코딩하는 유전자(pta)와 아세트산 키나제를 코딩하는 유전자(ackA)가 결실되어 있고, 혐기적 조건에서 다른 유기산은 거의 생성하지 않으면서 숙신산을 고농도로 생성하는 특성을 가지는 루멘 박테리아 변이균주 및 상기 변이균주를 혐기적 조건에서 배양하여 고수율

로 숙신산을 제조하는 방법을 제공하는 효과가 있다. 또한, 본 발명은 루멘 박테리아의 *ldhA*, *pf1* 및 포스포피루브산 카르복실라제를 코딩하는 유전자(*ppc*)가 결실되어 있고, 혐기적 조건에서 다른 유기산은 거의 생성하지 않으면서 숙신산을 고농도로 생성하는 특성을 가지는 루멘 박테리아 변이균주 및 상기 변이균주를 혐기적 조건에서 배양하여 고수율로 숙신산을 제조하는 방법을 제공하는 효과가 있다.

<93> 본 발명에 따른 만헤이미아 속 LPK7와 LPK4 균주는 이산화탄소로 포화된 혐기적 조건에서는 숙신산을 생산하고, 산소에 대한 저항성이 높은 통성혐기성 균주이기 때문에, 상기 균주를 이용하여 숙신산을 제조하는 방법은 절대 혐기성 균주를 이용하여 숙신산을 생산하는 종래의 방법에 비해 산소노출 등으로 인한 발효공정의 불안정성을 획기적으로 제거할 수 있을 뿐만 아니라, 다른 유기산의 생성을 제거함으로써, 정제공정과 생산수율의 최적화 및 극대화를 이루는 것이 가능하다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

루멘 박테리아 변이균주에 있어서, 젖산 탈수소화효소를 코딩하는 유전자(ldhA), 피루브산-개미산 분해효소를 코딩하는 유전자(pf1), 포스포트랜스아세틸화효소를 코딩하는 유전자(pta) 및 아세트산 키나제를 코딩하는 유전자(ackA)가 결실되어 있고, 혐기적 조건에서 다른 유기산은 거의 생성하지 않으면서 숙신산을 고농도로 생성하는 특성을 가지는 루멘 박테리아 변이균주.

【청구항 2】

루멘 박테리아 변이균주에 있어서, 젖산 탈수소화효소를 코딩하는 유전자(ldhA), 피루브산-개미산 분해효소를 코딩하는 유전자(pf1) 및 포스포피루브산 카르복실라제를 코딩하는 유전자(ppc)가 결실되어 있고, 혐기적 조건에서 다른 유기산은 거의 생성하지 않으면서 숙신산을 고농도로 생성하는 특성을 가지는 루멘 박테리아 변이균주.

【청구항 3】

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 루멘 박테리아는 만헤이미아 속(*Mannheimia* sp.), 액티노바실러스 속(*Actinobacillus* sp.) 및 엔에어로바이오스피리illum 속(*Anaerobiospirillum* sp.)으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 루멘 박테리아 변이균주.

【청구항 4】

제3항에 있어서, 상기 루멘 박테리아는 만헤이미아 속(*Mannheimia* sp.) 균주인 것을 특징으로 하는 루멘 박테리아 변이균주.

【청구항 5】

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 루멘 박테리아는 다른 유기산은 생성하지 않으면서 숙신산만을 생성하는 동형발효 균주인 것을 특징으로 하는 루멘 박테리아 변이균주.

【청구항 6】

제1항에 있어서, 만헤이미아 속 LPK7인 것을 특징으로 하는 변이균주.

【청구항 7】

제6항에 있어서, 만헤이미아 속 LPK7(KCTC 10626BP)인 것을 특징으로 하는 변이균주.

【청구항 8】

제3항에 있어서, 만헤이미아 속 LPK4인 것을 특징으로 하는 변이균주.

【청구항 9】

만헤이미아 속(*Mannheimia* sp.), 액티노바실러스 속(*Actinobacillus* sp.) 및 언에어로바 이오스피리움 속(*Anaerobiospirillum* sp.)으로 구성된 군에서 선택되고, 젖산 탈수소화효소를 코딩하는 유전자(ldhA) 및 피루브산-개미산 분해효소를 코딩하는 유전자(pf1)가 결실되어 있는 루멘 박테리아 균주로부터 포스포트랜스아세틸화효소를 코딩하는 유전자(pta) 및 아세트산 키나제를 코딩하는 유전자(ackA)를 추가로 결실시키는 것을 특징으로 하는, 혐기적 조건에서 다른 유기산은 거의 생성하지 않으면서 숙신산을 고농도로 생성하는 특성을 가지는 루멘 박테리아 변이균주의 제조방법.

【청구항 10】

만헤이미아 속(*Mannheimia* sp.), 액티노바실러스 속(*Actinobacillus* sp.) 및 언에어로바 이오스피리움 속(*Anaerobiospirillum* sp.)으로 구성된 군에서 선택되고, 젖산 탈수소화효소를 코딩하는 유전자(ldhA) 및 피루브산-개미산 분해효소를 코딩하는 유전자(pf1)가 결실되어 있는 루멘 박테리아 균주로부터 포스포피루브산 카르복실라제를 코딩하는 유전자(ppc)를 추가로 결실시키는 것을 특징으로 하는, 혐기적 조건에서 다른 유기산은 거의 생성하지 않으면서 숙신산을 고농도로 생성하는 특성을 가지는 루멘 박테리아 변이균주의 제조방법.

【청구항 11】

제9항 또는 제10항에 있어서, 상기 젖산 탈수소화효소를 코딩하는 유전자(ldhA) 및 피루브산-개미산 분해효소를 코딩하는 유전자(pf1)가 결실되어 있는 루멘 박테리아 균주는 만헤이

미아 속 LPK 균주(KCTC 10558BP)인 것을 특징으로 하는 루멘 박테리아 변이균주의 제조방법.

【청구항 12】

제9항에 있어서, 상기 pta 및 ackA 유전자의 결실은 상동성 재조합에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 루멘 박테리아 변이균주의 제조방법.

【청구항 13】

제12항에 있어서, 상기 상동성 재조합은 결실된 pta 및 ackA 유전자를 포함하는 유전자 교환백터를 사용하여 수행되는 것을 특징으로 하는 루멘 박테리아 변이균주의 제조방법.

【청구항 14】

제13항에 있어서, 상기 결실된 pta 및 ackA 유전자를 포함하는 유전자 교환백터는 pPTA-sacB인 것을 특징으로 하는 루멘 박테리아 변이균주의 제조방법.

【청구항 15】

제10항에 있어서, 상기 ppc 유전자의 결실은 상동성 재조합에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 루멘 박테리아 변이균주의 제조방법.

【청구항 16】

제15항에 있어서, 상기 상동성 재조합은 결실된 *ppc* 유전자를 포함하는 유전자 교환벡터를 사용하여 수행되는 것을 특징으로 하는 루멘 박테리아 변이균주의 제조방법.

【청구항 17】

제16항에 있어서, 상기 결실된 *ppc* 유전자를 포함하는 유전자 교환벡터는 *pPPC-sacB*인 것을 특징으로 하는 루멘 박테리아 변이균주의 제조방법.

【청구항 18】

결실된 *pta* 및 *ackA* 유전자를 포함하는 유전자 교환벡터 *pPTA-sacB*.

【청구항 19】

결실된 *ppc* 유전자를 포함하는 유전자 교환벡터 *pPPC-sacB*.

【청구항 20】

제1항 또는 제2항의 루멘 박테리아 변이균주를 혐기적 조건에서 배양하는 단계; 및 상기 배양액으로부터 숙신산을 회수하는 단계를 포함하는 숙신산의 제조방법.

【청구항 21】

제20항에 있어서, 혐기적 조건은 이산화탄소 및/또는 질소를 이용하여 조성하는 것을 특징으로 하는 숙신산의 제조방법.

【청구항 22】

제20항에 있어서, 상기 배양은 다른 유기산은 거의 생성되지 않으면서 숙신산만이 생성되는 동형발효인 것을 특징으로 하는 숙신산의 제조방법.

【청구항 23】

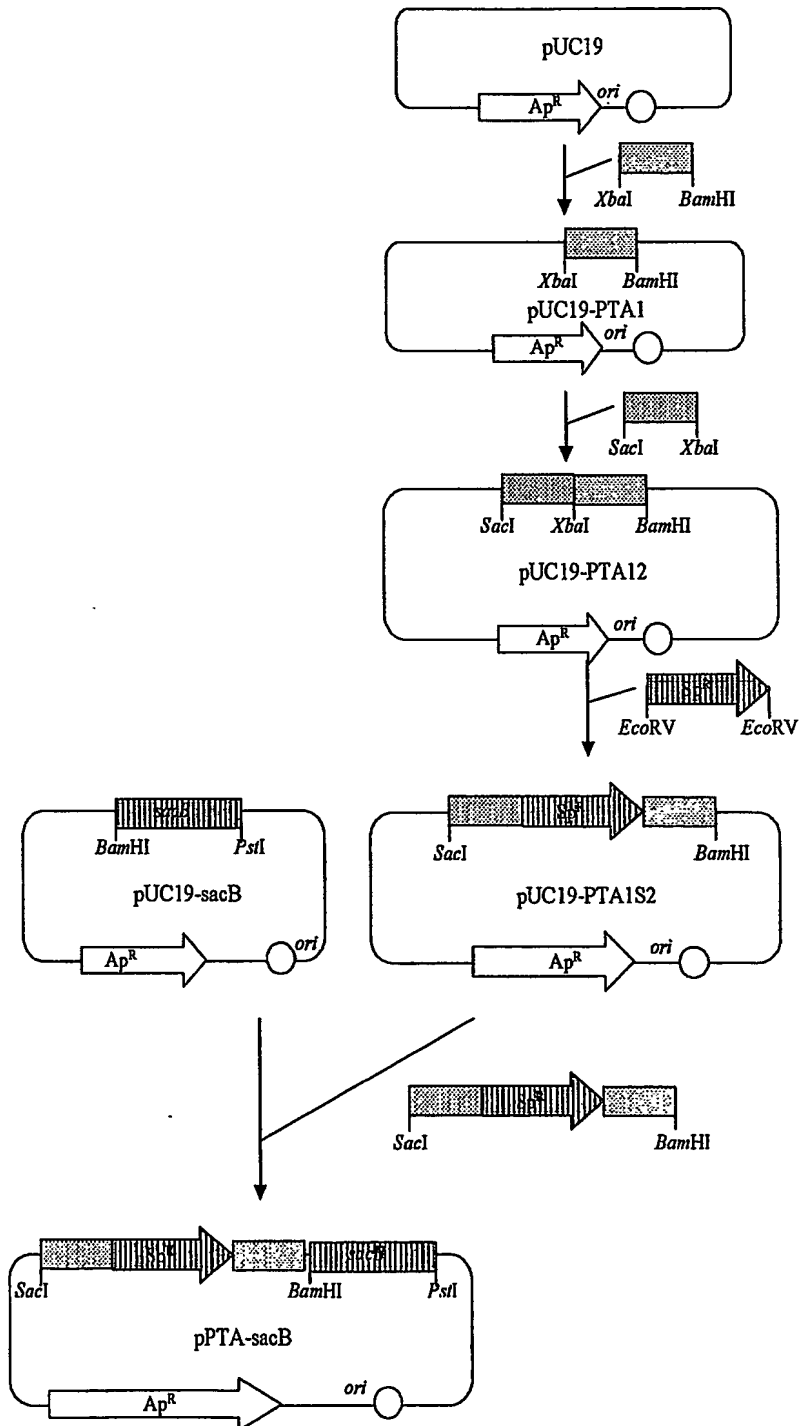
제20항에 있어서, 배양은 35~45℃의 온도와 6.0~7.5의 pH에서 이산화탄소 또는 이산화탄소를 포함하는 공기를 0.1~0.4vvm의 유속으로 공급하면서 수행하는 것을 특징으로 하는 숙신산의 제조방법.

【청구항 24】

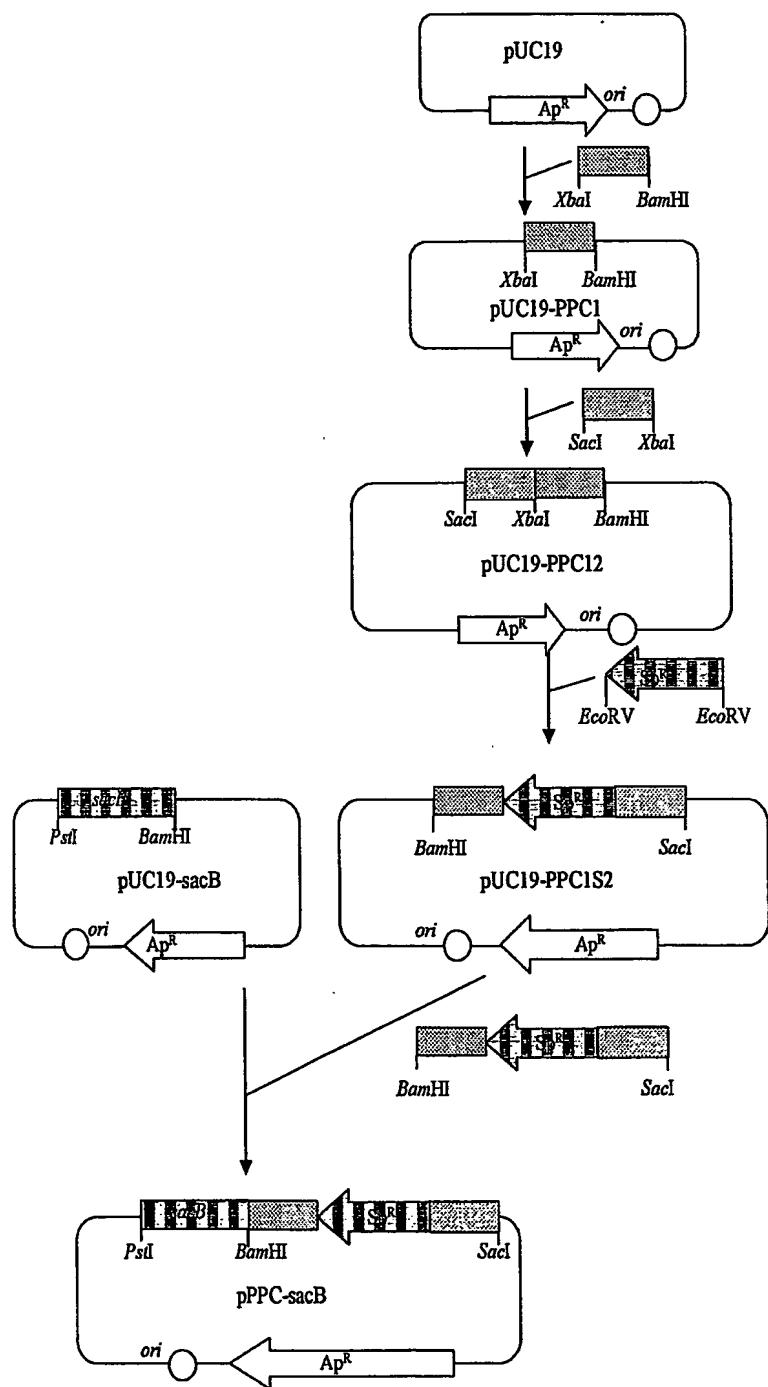
제20항에 있어서, 상기 루멘 박테리아 변이균주는 만헤이미아 속 LPK7 또는 LPK4인 것을 특징으로 하는 숙신산의 제조방법.

【도면】

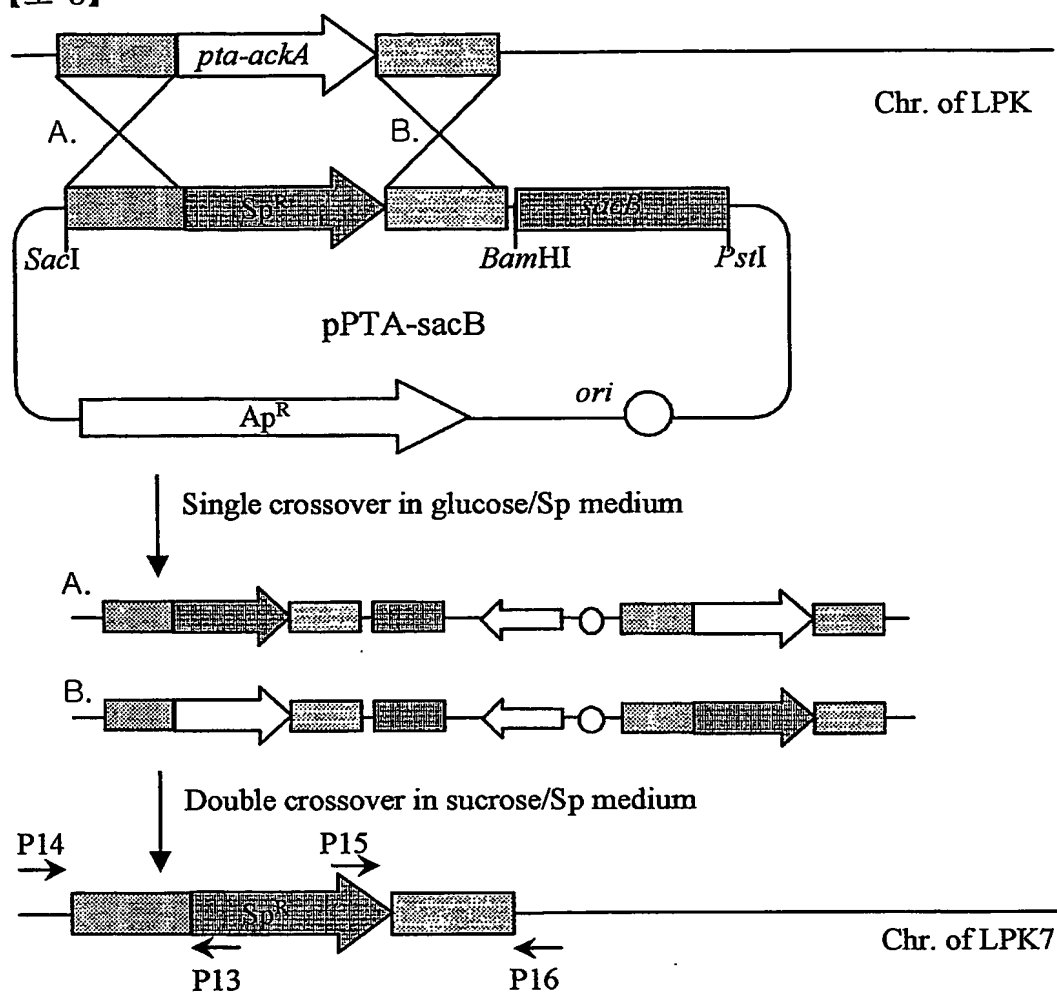
【도 1】



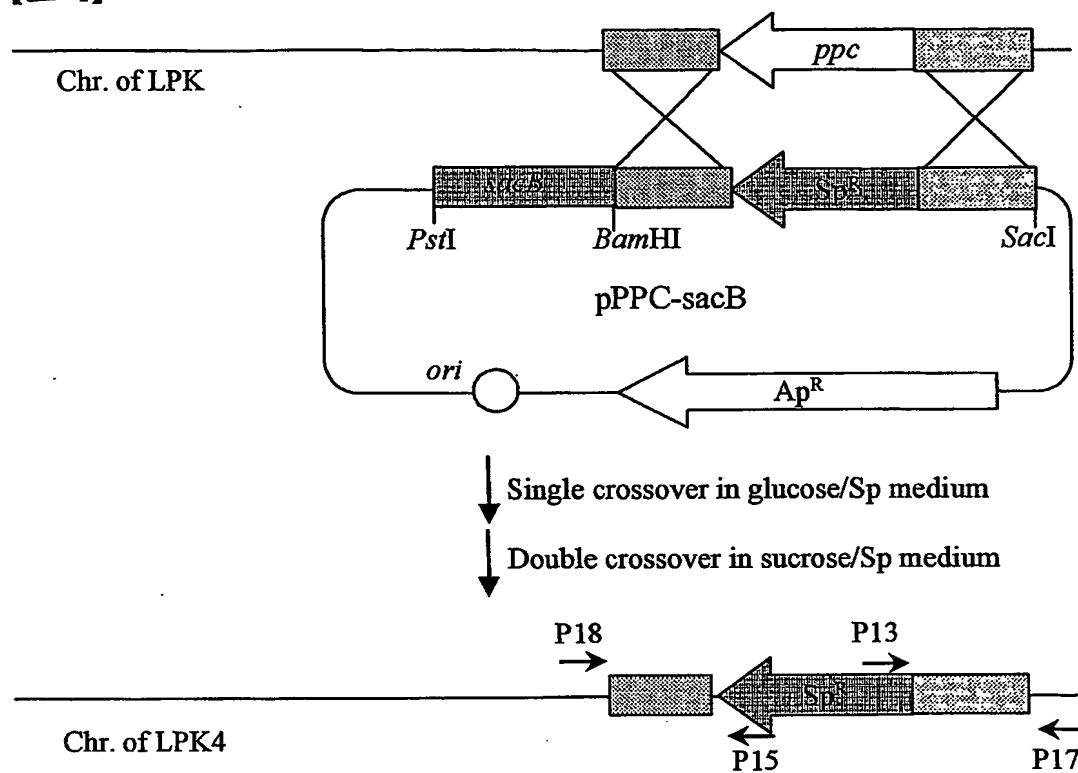
【도 2】



【도 3】

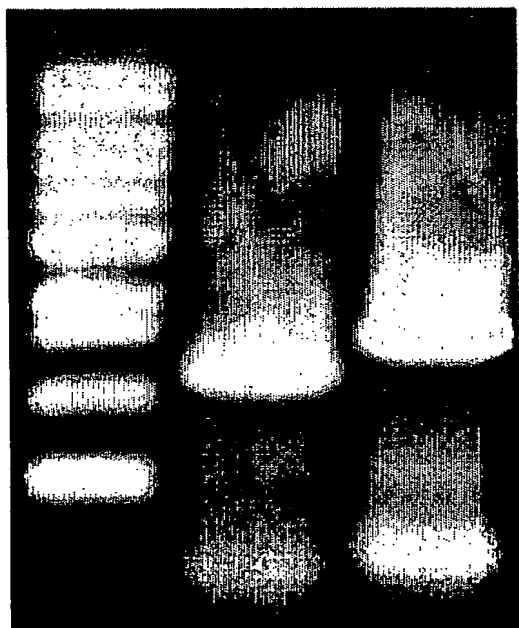


【도 4】



【도 5】

M **1** **2**



102 28105

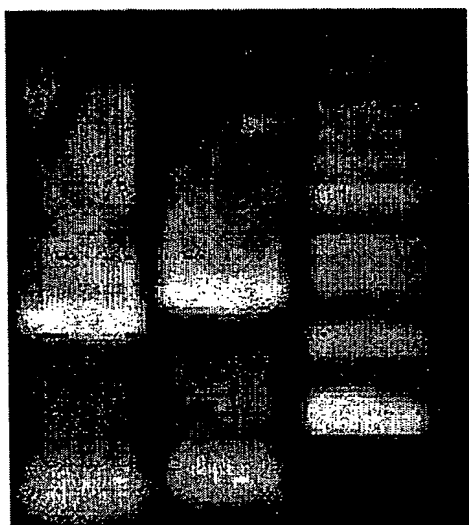
출력 일자: 2004/5/28

【도 6】

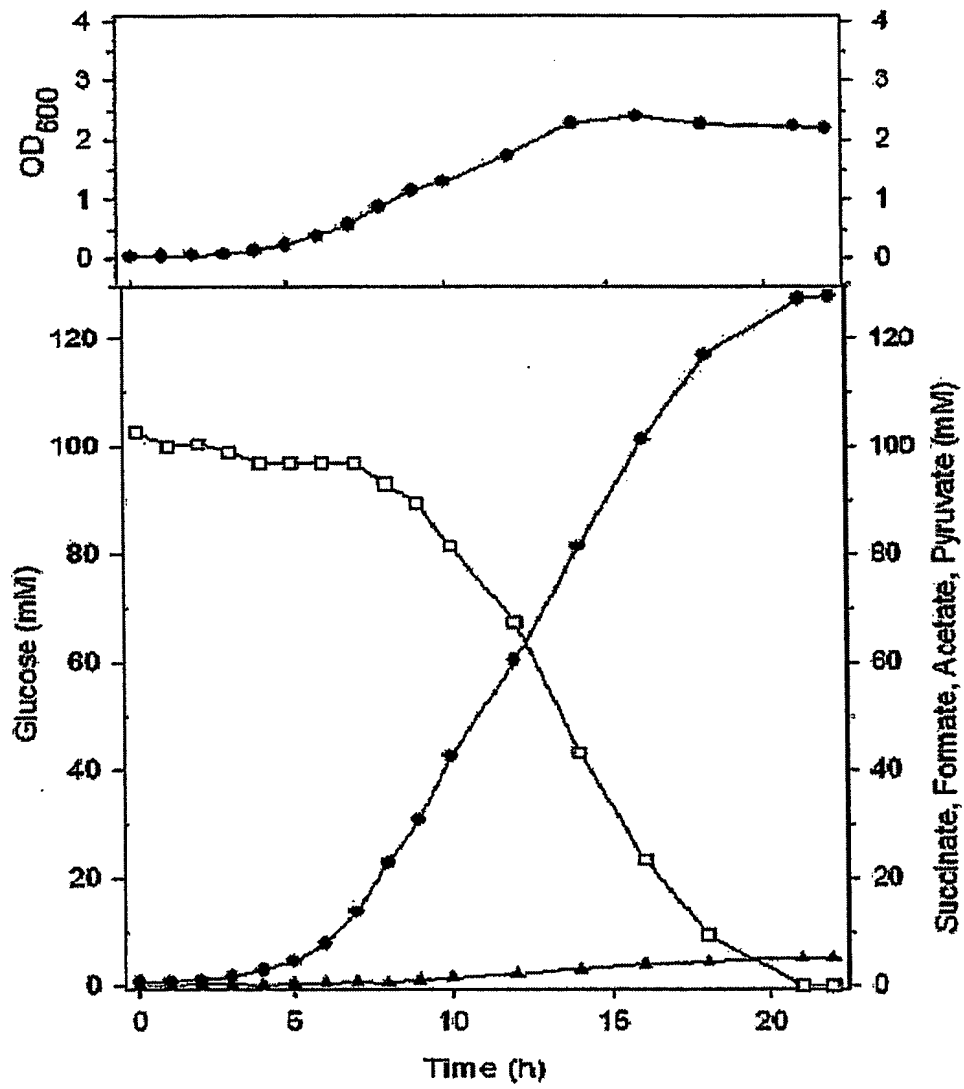
1

2

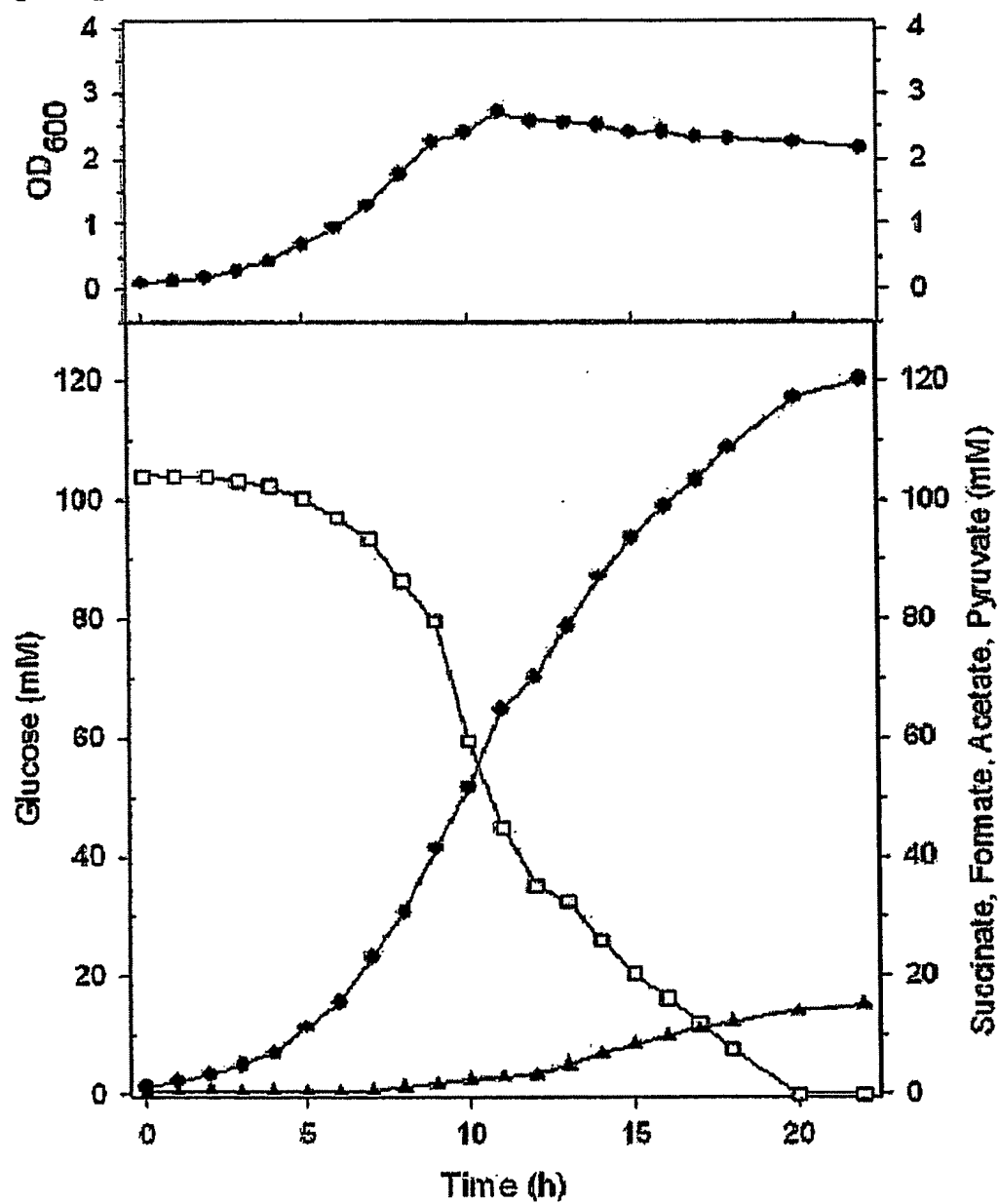
M



【도 7】



【도 8】



【서열목록】

서열목록 전자파일 첨부

【서지사항】

【서류명】	서지사항 보정서
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2004.05.07
【제출인】	
【명칭】	한국과학기술원
【출원인코드】	3-1998-098866-1
【사건과의 관계】	출원인
【대리인】	
【성명】	이처영
【대리인코드】	9-2003-000118-9
【포괄위임등록번호】	2003-015686-1
【사건의 표시】	
【출원번호】	10-2004-0028105
【출원일자】	2004.04.23
【심사청구일자】	2004.04.23
【발명의 명칭】	신규 루멘 박테리아 변이균주 및 이를 이용한 숙신 산의 제조 방법
【제출원인】	
【발송번호】	1-5-2004-0029396-01
【발송일자】	2004.05.03
【보정할 서류】	특허출원서
【보정할 사항】	
【보정대상항목】	첨부서류
【보정방법】	제출
【보정내용】	
【첨부서류】	1. 미생물기탁증명서_1통
【취지】	특허법시행규칙 제13조·실용신안법시행규칙 제8조의 규 정에의하여 위와 같 이 제출합니다. 대리인 이처영 (인)
【수수료】	
【보정료】	0 원
【기타 수수료】	0 원
【합계】	0 원

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.